

Title	Human diploid fibroblasts are resistant to MEK/ERK-mediated disruption of the actin cytoskeleton and invasiveness stimulated by Ras.
Author(s)	祐實, 泰子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46139
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 ^{すけ} 祐 ^{たけ} 貴 ^{たい} 泰 ^こ 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19724 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 6 月 20 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Human diploid fibroblasts are resistant to MEK/ERK-mediated disruption of the actin cytoskeleton and invasiveness stimulated by Ras.

(ヒト正常繊維芽細胞は Ras による MEK/ERK を介した細胞骨格の崩壊と浸潤能の獲得に強い抵抗性を示す。)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 平野 俊夫

(副査)

教 授 高井 義美 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

癌遺伝子によるトランスフォーメーションメカニズム解明の多くは、これまで鳥や齧歯類の細胞で行われてきた。もちろんこれらの研究が重要であることは明白ではあるが、ヒトの細胞は齧歯類の細胞と比較して、癌遺伝子によるトランスフォーメーションに対して、強い抵抗性を示す事が知られている。近年、細胞のトランスフォーメーションメカニズムは、ヒトと齧歯類では本質的に異なることが報告され始め、これまでの我々の研究でも、活性化 Ras が SV40 T 抗原などで不死化させた齧歯類の繊維芽細胞では強くトランスフォーメーションを誘導するのにに対して、hTERT と SV40 T 抗原によって不死化させたヒトの繊維芽細胞では、ほとんど変化を起こさない事が分かった。今回、活性化 Ras によるトランスフォーメーションは、細胞増殖の異常だけでなく、アクチンなどの細胞骨格の崩壊を伴う細胞の形態変化がよく知られている事に注目し、なぜヒトの繊維芽細胞が齧歯類の繊維芽細胞と比較してトランスフォーメーションに強い抵抗性を示すのか、その分子メカニズムの違いを明らかにするため、活性化 Ras による形態変化を中心に両種の違いを比較検討した。

[方法ならびに成績]

ラット及びヒトの正常繊維芽細胞を不死化するため、レトロウィルスベクターを用いて、ラットの細胞には SV40T 抗原、そしてヒトの細胞には hTERT と SV40T 抗原をそれぞれ発現し不死化した。そして、不死化した細胞に活性化 Ras を発現する事により、ラット及びヒトの正常繊維芽細胞で、どのように細胞の形態が変化するのか観察し、それに伴う変化を分子レベルで比較するために、生化学的手法を用い解析を行った。まず、Ras の発現により変化する細胞の形態を観察するため、細胞を免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡下で観察した。その結果、Ras を発現したラットの細胞は、アクチンのストレスファイバーの消失、接着斑の崩壊などを伴う著大な形態変化が見られたのに対し、ヒトの細胞では同程度かそれ以上の活性化型の Ras を発現しているにも関わらず、細胞の形態はほとんど変化しなかった。また、上記形態変化に伴って、ラットの細胞ではトロポミオシンの発現減少、そして ROCK/LIMK/Cofilin

系路の抑制が見られたが、ヒトの細胞では、ほとんど変化が見られなかった。そこで、この違いは Ras の下流に差があるのでないかと予測し、MEK の活性を特異的に阻害する薬、そして Ras の代わりに活性化型 MEK を発現させ、さらに解析を行った。結果、上述した Ras によるラット細胞の変化のほとんどは、活性化型 MEK の発現によっても同様に起こり、また MEK の特異的活性阻害剤でほぼ完全に抑えられることより、MEK/ERK 経路を介しているものと考えられたが、活性化型 MEK を導入しても、ヒトの細胞は、これらの変化に対して強い抵抗性を示した。

細胞の形態変化同様に、活性化型 Ras による細胞の浸潤能の獲得が知られている。そこで、マトリゲルインベージョンチェンバーを用いて細胞の浸潤能の比較を試みたところ、ラットの細胞では、Ras の下流で MEK の活性に依存して細胞の浸潤性、及び細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP9) の活性が亢進したが、ヒトの細胞は形態変化同様にこの現象に対しても強い抵抗性を示すことが解った。

[総括]

ラット正常繊維芽細胞では Ras の発現により、アクチンフィラメントの崩壊、細胞接着の減少などを伴う顕著な細胞骨格の形態変化が見られたが、ヒト正常繊維芽細胞では同程度の Ras を発現させても、同様な形態変化を示さず、Ras による細胞に浸潤能の獲得にも強い抵抗性を示した。これらの結果は、ヒト繊維芽細胞では MEK/ERK 経路の活性化により誘導されるトランスフォーメーションに対して、強い抵抗性を示す何らかのメカニズムが存在することを強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

これまで癌のメカニズムを理解するため、癌遺伝子がどのような過程を経て細胞を癌化するのか研究がなされてきた。しかし、実際の多くの研究は鳥や齧歯類の細胞を利用して行われており、それらの研究から癌の基本メカニズムについて多くの知見を得たことは事実だが、一方で、人と他の動物種での違いも次第に明らかになってきた。人の細胞を利用した癌化の研究が進まなかった背景には、長い間、正常な人の細胞は齧歯類の細胞と比較して癌化する事が困難だったからである。本研究では、なぜ人の細胞が癌化しにくいのか、そのメカニズムは何であるのかを明らかにするため、齧歯類の細胞と人の細胞で癌遺伝子が誘導する細胞の形態変化の違いに焦点を当てて解析し、人の細胞が齧歯類の細胞と比較して、癌遺伝子を発現しても細胞骨格の変化に強い抵抗性を示すという新しい知見を得た。この知見は、実際の人の癌の発症メカニズムを理解する上で非常に重要な発見であり、学位の授与に値すると考えられる。